



TITLE:

髄膜肺炎ウイルスに関する生化学的研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

多村, 憲

CITATION:

多村, 憲. 髄膜肺炎ウイルスに関する生化学的研究. 京都大学, 1963, 薬学博士

ISSUE DATE:

1963-03-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/211058>

RIGHT:

氏 名	多 村 憲 た むら あきら
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 3 号
学位授与の日付	昭 和 38 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	髄膜肺炎ウイルスに関する生化学的研究

(主 査)
論文調査委員 教授 鈴木友二 教授 井上博之 教授 高木博司

論 文 内 容 の 要 旨

オウム病群ウイルスは分類学上リケッチアと“真のウイルス”との中間に位置する大型ウイルスであり、ほかの小型ウイルスとの異同という点でその細胞内増殖機構に興味がもたれている。しかしその詳細な研究はほかの動物ウイルスに比して著しく遅れ、とくに生化学的研究はまだほとんど報告がない。著者は過去数年来オウム病群ウイルスに属する 髄膜肺炎ウイルス (Meningopneumonitis virus 以下 MPV と略称する) の細胞内増殖機構に関する生物学的、生化学的研究を行なってきた。

まず定量的な実験系の確立のため、MPV のブラックによる力価測定法の確立と MPV の浮遊培養細胞系における増殖に関する研究から実験を始めた。オウム病群ウイルスの力価測定にはこれまでマウス、発育鶏卵、培養細胞を使用した MLD_{50} (Mouse lethal doses), EID_{50} (Egg infectious doses), $TCID_{50}$ (Tissue culture infectious doses) 法等のいわゆる終末点稀釈法が一般に使用されてきた。しかしより詳細な定量的研究には上記の方法は測定誤差が大きく不適当であり、とくに今後の生化学的研究には一般の化学的定量法と対比し得る程度の精度をもつウイルスの力価測定法の確立が必要で、バクテリアウイルスで行なわれているごとくブラック計数法による力価測定法の確立がのぞまれる。著者は MPV を使用して宿主細胞の種類や培養液の条件について種々検討し、L細胞上に MPV のブラックを形成することに成功した。そこでブラック形成に必要なウイルスの吸着温度、吸着時間、培養液の組成、ブラック出現の様子等の至適条件をきめ、この方法が感度および便利さにおいて従来の終末点法にまさるとも劣らず、精度においてはるかに高い優秀な方法であることを確めた。

一方ウイルスの生化学的研究を行なうには化学的に扱い得るだけのかなり多量の材料を必要とする。それにはバクテリアウイルスの場合のごとき浮遊培養細胞での MPV の増殖系の確立が必要である。しかもこの浮遊培養系を使用すればウイルス-細胞相互に均質な実験系が得られ、ウイルスの吸着、増殖等の詳細な研究が可能となる。著者は幸にして浮遊 L細胞上で MPV を増殖させることに成功し、この系を使用して以後の生化学的実験の基礎となるべき MPV の一段増殖曲線に関する実験を行なった。すなわちウイ

ルスの細胞への吸着速度、吸着時のウイルス-細胞相互濃度の関係、MPV の増殖曲線および細胞当りのウイルス収量等を調べた。その結果感染後細胞内に新子孫ウイルス粒子の形成は18.5時間、その細胞外への放出は20時間より始まり、1細胞内で形成されるウイルス量は500PFU(Plaque forming unit)であることが判明した。またMPVはその増殖期間中に他の小型ウイルスと同様その感染性を消失する時期、すなわちEclipse phaseの存在が明らかとなった。

上記のごとき実験系を使用してMPV感染細胞内増殖機構に関する生化学的研究を行なうべく、まずウイルス感染後の感染細胞内全窒素、蛋白および核酸含量の増減を調べた。その結果窒素量および蛋白量は感染の前後を通じてほとんど有意の差を認めなかったが、核酸量は顕著な変化を示した。すなわちRNAは感染10時間以後に増加し、DNAは15時間以後に増加が見られた。MPVが感染細胞内に新子孫ウイルス粒子を形成するのは18.5時間以後であるから、ウイルス感染細胞内でウイルス粒子の形成に先行してRNAおよびDNAの合成が行なわれることが判明した。

そこでこの増加したRNAおよびDNAがウイルスの増殖に直接的な関係をもつか否かを調べる目的で感染20時間の細胞を核と細胞質にわかし、さらに細胞質を分画遠沈法で分画してRNAおよびDNAの細胞内分布を調べた。その結果増加したRNAおよびDNAの相当量が細胞質に存在し、しかもそれは6,000g 30分の遠沈沈渣に存在する。この沈渣には形態学的観察でウイルス発育中間体であるReticulate form(以下RFと略す)が存在する分画部であるから、増加したRNAおよびDNAはこのRFにassociateして存在し、ウイルスの増殖に直接的役割をもつものと考えられる。

一方MPV感染後の種々の時間にその感染細胞培養液に³H-Cytidineを添加し、一定時間後に細胞内RNA中に取り込まれた³H-Cytidineの細胞内分布をオートラジオグラフィ法により調べた。その結果感染10時間以後に合成される大部分のRNAはウイルス増殖の場である細胞質のRF存在部位に存在していることが判明した。この成績は上記の細胞成分分画法の成績とよく一致している。

最後にMPVの精製法とMPV粒子の化学組成について調べた。MPVは従来よりRNA-DNA型ウイルスと推測されているが、このウイルスの完全な精製法が確立されておらず、したがって直接的証明は未だない。従来の方法ではその精製標品中にMPV基本小体の他にその発育中間体であるRFの混在があり、それを除去することができなかった。著者は分画遠心、酵素処理および蔗糖密度勾配沈降分析法の適当な組み合わせにより、形態学的観察で全くRFを混有しないMPVの基本小体のみからなる完全な精製標品を得ることに成功した。この精製標品中の核酸含量をP³²ラベル法で調べたところ、DNAとはほぼ等量のRNAの存在が認められた。したがって基本小体はDNAのみを含有し、RNAは混在するRFに由来するのではないかという従来の懸念は解消され、MPVはRNA-DNA型ウイルスであることが確認された。

以上の実験成績よりMPVは細胞に感染後、新粒子の形成に先立ってDNA合成のみならず顕著な量のRNA合成が行われ、それらの核酸はウイルス増殖に直接的関係をもつRFに蓄積されることが判明した。しかもMPVはRNAまたはDNAのいずれか一方のみを含有する他の小型ウイルスと異って、その基本小体中にDNAのほかにRNAも混有することを明らかにし得た。このようなRNAがウイルスの増殖にどのような役割をはたしているかは今後の問題であるが、少なくともMPVの増殖にはRNAが特

殊な役割を有することが推測される。したがって他の小型ウイルスと異なり MPV では何故に DNA のほかに RNA を必要とするかという点で、今後 RNA の生物学的意義に関する研究に一つの研究材料を提供するものと考ええる。

論文審査の結果の要旨

著者はオウム病群ウイルスに属する髄膜肺炎ウイルス (Meningopneumonitis virus 以下 MPV と略称する) の細胞内増殖機構に関する生物学的、生化学的研究を行なった。

オウム病群ウイルスの力価測定にはこれまでマウス、発育鶏卵、培養細胞を使用した MLD₅₀ (Mouse lethal doses), EID₅₀ (Egg infectious doses), TCID₅₀ (Tissue culture infectious doses) 法などの、いわゆる終末点稀釈法が一般に使用されてきた。しかしより詳細な定量的研究には上記の方法は不適当であり、とくに今後の生化学的研究には一般の化学的定量法と対比しうる程度の精度をもつウイルスの力価測定法の確立が必要で、バクテリアウイルスで行なわれているごとくブラック計数法による力価測定法の確立がのぞまれる。著者は MPV を使用して宿主細胞の種類や培養液の条件について種々検討し、L細胞上に MPV のブラックを形成することに成功した。そこでブラック形成に必要なウイルスの吸着温度、吸着時間、培養液の組成、ブラック出現の様子などの至適条件をきめ、精度の高い方法を定めた。

一方著者は浮遊L細胞上で MPV を増殖させることに成功し、生化学的実験の基礎となるべき MPV の一段増殖曲線に関する実験を行なった。すなわちウイルスの細胞への吸着速度、吸着時のウイルス-細胞相互濃度の関係、MPV の増殖曲線および細胞当りのウイルス収量等をしらべた。その結果感染後細胞内に新子孫ウイルス粒子の形成は18.5時間、その細胞外への放出は20時間より始まり、1細胞内で形成されるウイルス量は500PFU (Plaque forming unit) であることが判明した。また MPV はその増殖期間中にほかの小型ウイルスと同様その感染性を消失する時期、すなわち Eclipse phase の存在が明らかとなった。

上記のごとき実験系を使用して MPV 感染細胞内増殖機構に関する生化学的研究を行ない、PNA は感染10時間以後に増加し、DNA は15時間以後に増加が見られた。MPV が感染細胞内に新子孫ウイルス粒子を形成するのは18.5時間以後であるから、ウイルス感染細胞内でウイルス粒子の形成に先行して PNA および DNA の合成が行なわれることが判明した。

この増加した PNA および DNA がウイルスの増殖に直接的な関係をもつか否かをしらべる目的で感染20時間の細胞を核と細胞質に分ち、さらに細胞質を分画遠沈法で分画して PNA および DNA の細胞内分布をしらべた。その結果増加した PNA および DNA の相当量が細胞質に存在し、しかもそれは6.000g 30分の遠沈沈渣に存在する。この沈渣には形態学的観察でウイルス発育中間体である Reticulate form (以下 RF と略す) が存在する分画部であるから、増加した PNA および DNA はこの RF に associate し存在し、ウイルスの増殖に直接的役割をもつものと考えられる。

また MPV 感染後の種々の時間にその感染細胞培養液に ³H-Cytidine を添加し、一定時間後に細胞内 PNA 中に取り込まれた ³H-Cytidine の細胞内分布をオートラジオグラフィ法によりしらべた。その結果感染10時間以後に合成される大部分の PNA はウイルス増殖の場である細胞質の RF 存在部位に存在していることが判明した。この成績は上記の細胞成分分画法の成績とよく一致している。

最後に MPV の精製法と MPV 粒子の化学組成についてしらべた。MPV は従来より PNA-DNA 型ウイルスと推測されているが、このウイルスの完全な精製法が確立されておらず、したがって直接的証明は未だない。従来方法ではその精製標品中に MPV 基本小体のほかにその発育中間体である RF の混在があり、それを除去することができなかった。著者は分画遠心、酵素処理および蔗糖密度勾配沈降分析法の適当な組み合わせにより、形態学的観察で全く RF を混有しない MPV の基本小体のみからなる完全な精製標品をうることに成功した。この精製標品中の核酸含量を P^{32} ラベル法でしらべたところ、DNA とほぼ等量の PNA の存在が認められた。したがって基本小体は DNA のみを含有し、PNA は混在する RF に由来するのではないかという従来の懸念は解消され、MPV は PNA-DN 型ウイルスであることが確認された。

以上の実験成績は今後 PNA の生物学的意義に関する研究に寄与することが大きく、したがって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認定する。